昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，May 2008，51(5)：466－472 ISSN 0454-6296

家蚕溶茧酶基因的真核表达及其产物的生物活性检测

吴玉丹[1]**，李　兵**[1,2]**，王文兵**[3]**，王　东**[1]**，沈卫德**[1,2,*]

（1.苏州大学生命科学学院，江苏苏州　215123； 2.苏州大学蚕桑研究所，江苏苏州　215123；
3.江苏大学生命科学研究院，江苏镇江　212013）

摘要：为了研究家蚕 *Bombyx mori* **溶茧酶基因（**cocoonae**）真核表达及其产物的生物活性，将溶茧酶基因（**GenBank **登录号** EF428980**）克隆至杆状病毒转移载体** pFastBac™ 1 **中获得** pFast-cocoonase**，将其转化** DH10Bac **感受态细胞后，**PCR **方法检测证实所分离的重组病毒** DNA **中含有目的片段溶茧酶基因。用脂质体法转染家蚕** BmN **细胞，获得重组病毒。**SDS-PAGE **分析显示，感染重组杆状病毒** Bac-cocoonase **的细胞表达产物在约为** 27.6 kD **处出现特异性条带，这与预测的蛋白大小相符。用该表达产物与茧丝反应后，电镜下观察茧丝的形态，结果表明表达产物对茧丝的丝胶层有一定的水解作用。**

关键词：家蚕；溶茧酶基因；真核表达；杆状病毒系统；Bac-to-Bac **系统**

中图分类号：S881.2；Q556⁺.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2008)05-0466-07

Eukaryotic expression of the cocoonase gene from *Bombyx mori* and biological activities of the expressed product

WU Yu-Dan[1]，LI Bing[1,2]，WANG Wen-Bing[3]，WANG Dong[1]，SHEN Wei-De[1,2,*]（1. School of Life Sciences，Soochow University，Suzhou，Jiangsu 215123，China；2. Institute of Sericulture，Soochow University，Suzhou，Jiangsu 215123，China；3. School of Life Sciences，Jiangsu University，Zhenjiang，Jiangsu 212013，China）

Abstract：In order to research the biological activity of cocoonase expressed through eukaryotic expression system，cocoonase gene（GenBank accession number：EF428980）was cloned into baculovirus transfer vector pFastBac™ 1 to obtain pFast-cocoonase，and this recombinant vector was then transformed into DH10Bac competent cells. Cocoonase gene was verified to have been successfully transferred to recombinant bacmid by PCR. BmN cells were transfected with the recombinant bacmid through lipofectin-mediated method to obatin recombinant baculovirus. SDS-PAGE analysis showed that a specific band of about 27.6 kD existed on the lane of expression products of recombinant baculovirus，which was consistent with predicted size of the target protein. SEM micrographs were taken after treating silkworm silk with the expressed protein，and the results showed that the expressed protein could hydrolyze sericine to some extent.

Key words：*Bombyx mori*；cocoonase；eukaryotic expression；baculovirus system；Bac-to-Bac system

作为溶茧酶天然底物的蚕丝是人类最早利用的天然蛋白质纤维之一。近年来，随着蚕丝科技的迅速发展及其与其他高新技术的交叉渗透，国内外学者对蚕丝蛋白新功能的研究越来越重视。目前，蚕丝蛋白及其降解产物已在食品（游斌，2002）、服装（汝玲等，2007）、日用化工（陈芳艳等，2002）、纺织（姚晋荣等，2003）、生物材料（刘永成等，1998；闵思佳等，1999；宋兆萍和于文祥，2000）等领域进行了广泛的开发利用，成为蚕业科学研究的热点之一。

虽然蚕丝蛋白的降解产物有着广泛的用途，但

基金项目：国家重点基础研究发展规划（“973”计划）项目（2005CB121005）；江苏省高校自然科学基础研究计划项目（07KJB230102）

作者简介：吴玉丹，男，1982 年生，河南南阳人，硕士研究生，主要从事家蚕分子生物学研究，Tel.：0512-65880264；E-mail：bluesky05168@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：0512-65880182；E-mail：shenwd@suda.edu.cn

收稿日期 Received：2007-11-26；接受日期 Accepted：2008-03-17

由于丝素蛋白是一种典型的 β-角蛋白，很难被普通的蛋白酶降解，其应用受到生产技术条件的制约。目前降解丝素生产丝肽主要采用盐解法（Chen *et al*.，2001）、酸解法（冀瑞琴等，2002）和碱解法（陈芳艳等，2002）等化学方法，但这些方法不是效果有限，就是会造成对氨基酸的破坏。因此，采用酶解法生产丝肽是一种比较理想的方法（刘冬和李世敏，2002）。美国学者（Kafatos *et al*.，1967）在家蚕蛾的消化系统中发现了一种可以水解丝素和丝胶的蛋白质。这一发现使得理想的丝肽生产技术的提出成为可能，但利用天然溶茧酶蛋白来制备小分子生物活性肽的方法也存在缺陷。首先，天然溶茧酶的来源有限，受到时间的限制，必须等到蛹羽化成蛾后才能收集其由口腔吐出的液体（其中含有溶茧酶）；其次是该蛋白不容易纯化，稳定性差，离开母体后，活性丧失得较快，不利于保存。本实验室拟采用分子生物学的方法来解决溶茧酶来源有限的难题。

本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒-昆虫表达系统在家蚕 *Bombyx mori* 细胞系 BmN 中表达了溶茧酶蛋白，并对其生物活性进行了初步检测。这种真核表达系统安全性高，能够容纳较大的外源基因，重组病毒易于筛选，并且具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点，是表达溶茧酶蛋白的理想体系。我们期望能够证实含有溶茧酶基因的重组病毒感染的 BmN 细胞液具有水解丝蛋白的能力，为今后丝肽生产技术的发展提供技术储备。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

家蚕品种为皓月，杆状病毒转移载体 pFastBac™ 1、感受态 DH10Bac 受体菌、大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 以及家蚕 BmN 细胞系均由本实验室培养并保存；含有溶茧酶基因的重组载体 pUCm-T-cocoonase 也由本实验室构建并保存。T4 DNA Ligase、蛋白分子量标准以及昆虫细胞培养 TC-100 和胎牛血清 FBS 购自上海生工生物工程服务有限公司；质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品；核酸分子量标准、限制性内切酶、反应缓冲液及其他化学常规试剂均购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.2　引物的设计与合成及重组载体 pUCm-T-cocoonase 的构建

我们根据在 NCBI 搜索到的溶茧酶部分序列（GenBank 登录号：AB257565）设计引物，利用 RACE 方法分别克隆了家蚕溶茧酶 cDNA 的 5′端和 3′端，得到了家蚕溶茧酶全长 cDNA 片段（GenBank 登录号：EF428980）。根据该序列设计引物，我们得到了家蚕溶茧酶基因完整的编码区序列（783 bp），并将该序列连接进载体 pUCm-T 中，得到了重组质粒 pUCm-T-Cocoonase（赵晓瑜和李继刚，2006），并送交上海生工生物工程有限公司进行测序。

设计可扩增家蚕溶茧酶基因编码区片段的引物为 $\mathrm{COW_1}$：5′-GCTGGATCC*ATG*GAAAA GTTGTATCTGTT-3′，下划线表示 *Bam*HⅠ酶切位点，斜体表示起始密码；$\mathrm{COW_2}$：5′-ATTAAGCTT*TTA*TAGGCCCGCCGTTG-3′，下划线表示 *Hin*dⅢ酶切位点，斜体表示终止密码。重组病毒鉴定用引物（pUC/M13）为 $\mathrm{P_1}$：5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′；$\mathrm{P_2}$：5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′。

上述引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.3　溶茧酶基因的生物软件分析

用 DNAMAN 序列分析软件将 DNA 序列翻译成蛋白质序列（Misener and Krawetz，2005）；Peptool 软件分析预测溶茧酶蛋白的二级结构；Omiga 2.0 软件分析溶茧酶的氨基酸序列模式。

信号肽查找用 Signal P 3.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）程序分析。蛋白质功能预测应用软件 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）完成。

1.4　重组杆状病毒转移载体 pFast-cocoonase 与 Bacmid 穿梭载体的构建

以鉴定正确的 pUCm-T-cocoonase 质粒为酶切对象，用 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ双酶切，回收溶茧酶片段，将目的基因亚克隆至经同样双酶切的 pFastBac™ 1 载体上。该载体不带有 His 标签序列，优点是表达出的蛋白质更接近天然蛋白，缺点是不容易纯化，很难对表达蛋白的性质进行定量分析。

接下来按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 系统说明书，将鉴定为阳性的重组杆状病毒转移载体 pFast-Cocoonase 约 1 ng 转化 BmDH10Bac 感受态细胞中（图 1），涂布于含有 X-gal 100 μg/mL、IPTG 40 μg/mL、庆大霉素 7 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL、四环素 10 μg/mL、氨苄青霉素 100 μg/mL 的 LB 平板上，37℃ 培养 48 h，挑取白色单菌落，接种于 3 mL 含有上述 4 种抗生素的 SOC 培养基中，过夜培养，然后提取重组 Bacmid（Bac-cocoonase），用位于 Bacmid 中 mini attTn7 两端的 pUC/M13 引物对重组 Bacmid 进行 PCR 鉴定。阳性重组 Bac-cocoonase 和无插入片段的亲本病毒 DNA 约 1 μg 用于转染 BmN 细胞。

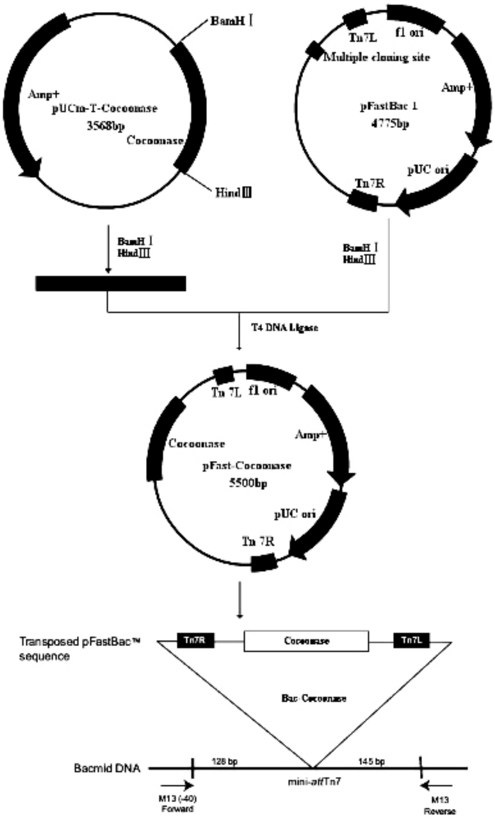

图 1 杆状病毒转移载体的构建及其与 Bacmid 的重组

Fig. 1 Construction of donor plasmid and recombinant Bac-cocoonase

1.5 重组病毒 Bac-cocoonase 在昆虫细胞 BmN 中的表达

取阳性重组 Bac-cocoonase 20 μL，用无血清培养基 TC-100 补充体积至 100 μL，同样取 10 μL 脂质体，也用无血清培养基 TC-100 补充体积至 100 μL。将上述两种溶液混匀，室温静止 15 min。然后把 200 μL 溶液加入到含用无血清培养基 TC-100 培养的 BmN 细胞的容器中，3 h 后换成含 10% 小牛血清的 TC-100 培养基培养 BmN 细胞。28℃培养 72 h，观察细胞病变。细胞出现明显病变后，取出细胞上清 -70℃保存，同时取一部分病毒液继续感染昆虫细胞，72 h 后收集病变细胞。

1.6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

收集重组病毒感染 72 h 后的病变细胞，用 PBS（0.1 mol/L，pH = 7.4）洗 2 次，加 100 μL PBS 混匀后，再加入 SDS-PAGE 上样缓冲液 100 μL 煮沸 5 min。同时按上述方法处理正常细胞及无插入片段的亲本病毒转染的 BmN 细胞作为对照。经 SDS-PAGE 电泳（12%），并染色、脱色后拍照保存。

1.7 家蚕茧丝及蛾吐出液的收集

在实验室饲养家蚕皓月至 5 龄结茧后，我们取其新鲜茧壳，从其中抽取茧丝若干。蛾吐出液的收集参照王厚伟等（2005）的方法，并加以改进。在羽化前一天，将收集管放在 4℃金属浴内收集蛾吐出液，待收集完成后及时转移到 -70℃超低温冰箱内保存。

1.8 表达产物的活性检测

分别收集重组病毒和无插入片段的亲本病毒感染 72 h 后的病变细胞，3 000 r/min 离心 15 min，弃去上清，用 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 200 μL 缓冲液溶解，超声波破碎。剪取一指宽的铝片，贴上双面胶，将若干处理过的茧丝贴在双面胶上。分别取超声波破碎后的空病毒细胞液，重组病毒细胞液和收集的蛾吐出液各 20 μL，滴在茧丝上，25℃ 反应 30 min 后放入烘箱中 80℃ 灭活 10 min。取出铝片，在电镜（S-4700）下观察茧丝形态。

2 结果与分析

2.1 家蚕溶茧酶氨基酸序列分析及其二级结构预测

家蚕溶茧酶基因编码区全长 783 bp，编码 260 个氨基酸（GenBank 登录号：EF428980），预测蛋白质分子量是 27.6 kD，等电点（pI）为 8.886。用 Signal P 3.0 Server 程序分析家蚕溶茧酶，预测其从第 1 ~ 22 位为信号肽序列（singal peptide），信号肽酶在 Cys^{22}-Thr^{23} 切割前肽原产生 25 kD 的溶茧酶；而用 Peptool 软件进行结构预测，也提示从第 1 到 23 个氨基酸形成一跨膜螺旋，且整个氨基酸序列中只有一个跨膜螺旋区（图 2）。除了结构预测外，我们还利用 Peptool 软件对溶茧酶蛋白进行了疏水性分析。由图 3 所示，4 ~ 9 区域为连续的高疏水区，10 ~ 32 为连续的亲水区域，33 ~ 260 区域呈现规律的亲疏水交替分布。

SMART 分析结果预测其从第 34 ~ 254 位氨基酸序列具有类胰蛋白的丝氨酸蛋白酶（trypsin-like serine protease）活性。以 Omiga 2.0 软件对溶茧酶基因氨基酸序列进行蛋白位点和序列模式分析表明，其编码蛋白含有胰蛋白酶组氨酸活性位点（TRYPSIN_HIS）可能有 1 个，酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点（CK2_PHOSPHO_SITE）可能有 5 个，肉豆蔻基

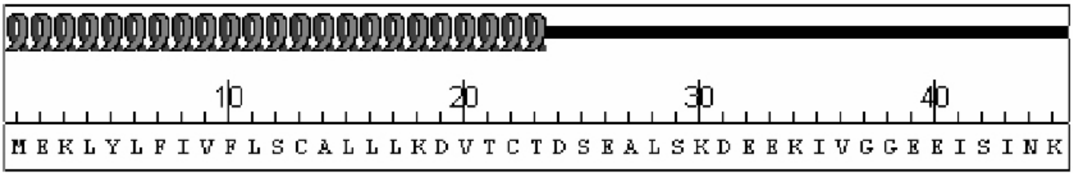
10
20
30
40
M E K L Y L F I V F L S C A L L L K D V T C T D S E A L S K D E E K I V G G E E I S I N K

图 2　Peptool 软件预测的氨基酸跨膜区图

Fig. 2　Transmembrane helical region of the predicted amino acids using Peptool software

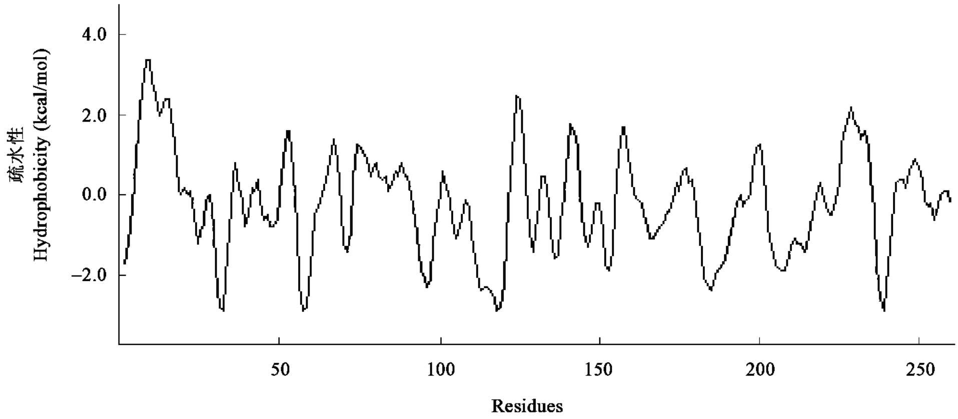

图 3　家蚕溶茧酶基因氨基酸疏水性图

Fig. 3　Amino acid hydrophobicity of the cocoonase gene from *Bombyx mori*

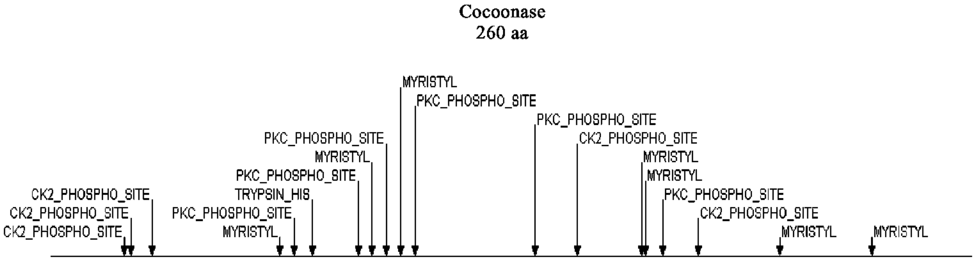

图 4　家蚕溶茧酶编码蛋白的模式位置图

Fig. 4　Motif pattern of the predicted cocoonase from *Bombyx mori*

（*MYRISTYL*）位点可能有 7 个，蛋白激酶 *C* 磷酸化位点（*PKC*_ PHOSPHO_ SITE）可能有 6 个。图 4 示出各序列模式（Motif）在氨基酸全序列中的位置。

2.2　重组转移载体 pFast-cocoonase 与重组 Bac-cocoonase 穿梭载体的鉴定

从鉴定正确的 pUCm-T-cocoonase 质粒中用 *Bam*HⅠ、*Hin*dⅢ切出 cocoonase 片段，克隆到转移载体 pFastBac™ 1 中得到重组质粒 pFast-cocoonase，经 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ双酶切鉴定（图 5），结果显示从重组质粒 pFast-cocoonase 切下的片段与家蚕溶茧酶基因编码区片段的大小一致，说明家蚕溶茧酶基因的 cDNA 已正确克隆进入 pFastBac™ 1 载体。另外，将该质粒送交生物公司测序，测序结果与已报道的溶茧酶编码区序列（AB257565）完全一致。

为了验证重组病毒中溶茧酶基因是否存在，以转化 pFast-cocoonase 质粒所获得的重组 Bac-cocoonase 为模板，分别用溶茧酶引物 COW_1 和 COW_2 及 pUC/M13 引物进行 PCR 扩增鉴定，结果均在约 780 bp 和 3 200 bp（病毒基因组：2 340 bp；cocoonase：783 bp）处有明显的阳性条带，各 PCR 产物的分子量与预期值相符（图 6）。这说明 cocoonase 基因片段在 DH10Bac 受体菌中已发生了正确的转座。

2.3　重组 Bacmid 转染家蚕 BmN 细胞

在无血清条件下，用 lipofectin 介导重组 Bac-cocoonase 的基因组 DNA 转染生长状态良好的 BmN

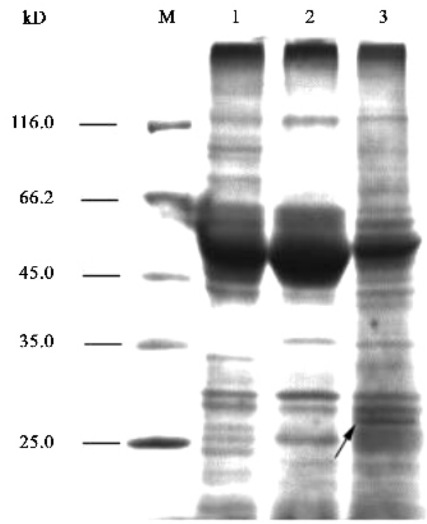

图 8　溶茧酶基因在 BmN 细胞中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 8　SDS-PAGE analysis of Bac-Cocoonase expression products in BmN cells

M：标准分子量蛋白 Protein molecular weight marker；1：**正常 BmN 细胞的表达产物** Total extracts of normal BmN cells；2：Bacmid **病毒感染的细胞总抽提物** Total extracts of BmN cells infected with Bacmid；3：**感染重组病毒** Bac-cocoonase **的细胞总抽提物** Total extracts of BmN cells infected with identification of recombinant virus Bac-cocoonase

茧丝反应后，茧丝的形态变化更加明显，茧丝的整个表面已经被降解，呈现出凸凹不平的不规则形态。电镜观察结果进一步证明了溶茧酶基因在 BmN 细胞中得到了成功表达。

3　讨论

研究家蚕溶茧酶，将会使我们对家蚕蛾脱茧而出这一生理过程的认识更加清晰明确，具有重要的理论价值。不仅如此，作为溶茧酶天然底物的蚕丝蛋白还有着广泛的用途。长期以来，蚕丝的主要价值体现在纺织工业上，最近几年来对它的不断研究开发，使得它的应用范围已涵盖食品、医药、精细化工、生物技术等诸多领域，如应用于手术后的缝合线、涂料、化妆品、药物的缓慢释放、分离膜及生物活性物的固定化和生物传感器的制作等，此外蚕丝蛋白还具有解酒，降低血液胆固醇，促进胰岛素分泌，降低血压，防治帕金森氏症的作用。可以预见溶茧酶的研究对蚕丝蛋白的进一步开发利用也将产生积极的影响。

用生物软件对溶茧酶的氨基酸结构进行分析，预测该蛋白从第 1 到 23 个氨基酸形成一跨膜螺旋。而人们对膜蛋白的研究发现，膜蛋白常含有大量的 α-螺旋，其中跨膜 α-螺旋长度大致为 19 个残基，序列特征明显，比较适合用预测的方法确定跨膜螺旋区段的位置（李萍等，2000）。由于膜蛋白穿过膜的磷脂双分子层，这种特殊的环境决定了跨膜区必须由强疏水的氨基酸组成（邱建丁等，2004）。我们还用 Signal P 3.0 Server 程序分析了该序列，表明在 N 端存在信号肽序列，推测该信号肽有膜插入功能，在新生蛋白质分子通过内质膜的过程中从 22 和 23 位中被切除，而溶茧酶蛋白的成熟肽部分通过高尔基体移向细胞表面，并在高尔基体内发生糖基化（吕鸿声，1998）。另外，利用 Omiga 2.0 软件对该蛋白质可能的修饰位点进行分析，发现该蛋白含有胰蛋白酶组氨酸活性位点，并且有多个位点可以发生磷酸化修饰和糖基化修饰。蛋白的磷酸化和脱磷酸化在细胞信号传导中起重要作用，磷酸化、糖基化及胰蛋白酶组氨酸活性位点可能是溶茧酶蛋白完成其生理功能的结构基础。该蛋白序列中酪蛋白激酶 II 磷酸化

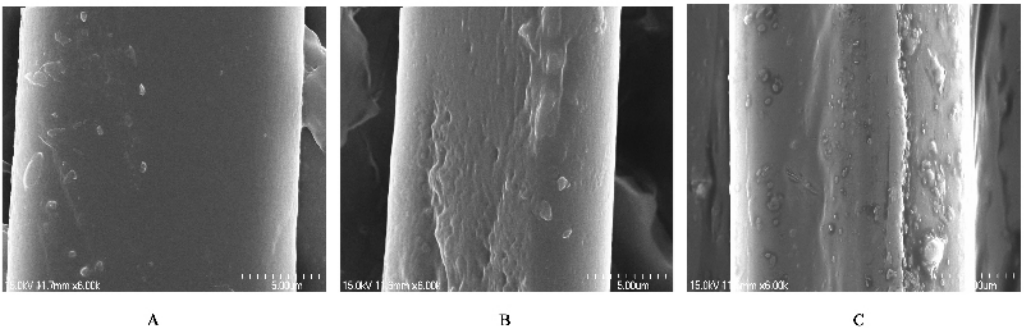
A　B　C

图 9　茧丝被降解的扫描电镜图片

Fig. 9　SEM micrographs of degraded floss silks showing changes in silk surface

A：**与 Bacmid 病毒感染的细胞液反应后的茧丝** Silk treated with expression products of cells infected by empty bacmid；B：**与重组病毒 Bac-cocoonase 感染的细胞液反应后茧丝** Silk treated with expression products of cells infected by Bac-cocoonase；C：**与蛾吐出液反应后的茧丝** Silk treated with moth secretion fluid.

可能位点有5个，推测酪蛋白激酶Ⅱ（CKⅡ）对该蛋白生物功能的发挥具有重要的调节作用。

杆状病毒表达载体系统（baculovirus expression vector system，BEVS）是一个以昆虫杆状病毒为外源基因载体，以昆虫和昆虫细胞为受体的表达系统。与细菌、酵母和哺乳动物细胞表达系统相比，它具有表达水平高、表达产物可进行翻译后加工，其抗原性、免疫原性和功能等生物活性与天然蛋白相似，并可通过感染昆虫幼虫而实现大规模低成本生产基因工程产品(赵雪丽等，2007)。并且我们使用的Bac-to-Bac系统较以往构建重组病毒的方法具有更多的优越性，主要表现在：异源基因在与杆状病毒的同源重组发生在DH10Bac™(含有杆状病毒)菌中，不需要空斑纯化就能够得到遗传上绝对均一的重组病毒。

本研究采用含有溶茧酶基因的重组病毒感染的BmN细胞液与茧丝反应，在电镜下观察茧丝的形态，结果虽然证明表达产物对茧丝的丝胶层有一定的水解作用，但该产物能否溶解丝素蛋白还未可知，有待进一步研究。

参考文献（References）

Chen FY，Ji PX，Wang LC，Peng WF，2002. Study on the inhibiting-ability of the black pigment formation with different hydrolytic degree of silk fibroin peptide. *Journal of South China Agricultural University*，23(4)：8-10.［陈芳艳，纪平雄，王林川，彭文芳，2002. 不同水解程度丝素肽对黑色素生成抑制能力的研究. 华南农业大学学报，23(4)：8-10］

Chen X，Knight DP，Shao ZZ，Vollrath F，2001. Regenerated *Bombyx* silk solutions studied with rheometry and FTIR. *Polymer*，42：9 969-9 974.

Ji RQ，Wang XY，Shi SL，Xia RX，Wang AY，Chen JW，2002. Preparing complex amino acids from hydrolysis of *Antheraea pernyi* silk fibroin by catalyzed phosphoric acid. *Journal of Shenyang Agricultural University*，33(3)：200-201.［冀瑞琴，王学英，石生林，夏润玺，王爱荣，陈俊文，2002. 磷酸催化水解柞蚕丝制取复合氨基酸的研究. 沈阳农业大学学报，33(3)：200-201］

Kafatos FC，Tartakoff AM，Law JH，1967. Cocoonase. I. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. *J. Biol. Chem.*，242 (7) ：1 477-1 487.

Liu D，Li SM，2002. Study on technical conditions of silkworm cocoon fibroin hydrolysed with enzymes. *Food and Fermentation Industries*，28(2)：41-44.［刘冬，李世敏，2002. 丝素肽酶法生产工艺条件研究. 食品与发酵工业，28(2)：41-44］

Lu HS，1998. Molecular Biology of Insect Viruses. China Agricultural Scientech Press，Beijing. 280-281.［吕鸿声，1998. 昆虫病毒分子生物学. 北京：中国农业科技出版社. 280-281.］

Li P，Guo T，Li YD，Sun ZR，2000. Analysis and prediction of protein transmembrane helical regions by wavelet transformation. *Acta Biophysica Sinica*，3(16)：577-585.［李萍，过涛，李衍达，孙之荣，2000. 基于小波分析的膜蛋白跨膜区段序列分析和预测. 清华大学生物物理学报，3(16)：577-585］

Liu YC，Shao ZZ，Sun YY，Yu TY，1998. The structure and function of silk fibroin. *Polymer Bulletin*，3：17-23.［刘永成，邵正中，孙玉宇，于同隐，1998. 蚕丝蛋白的结构和功能. 高分子通报，3：17-23］

Misener S，Krawetz SA（Translated by Ou Yang HS *et al.*），2005. Bioinformatics Methods and Protocols. Science Press，Beijing. 56-71.［S.米塞诺，S.A.克拉维茨著(欧阳红生等译)，2005. 生物信息学方法指南. 北京：科学出版社. 56-71］

Min SJ，Yao JM，Zhu LJ，Koji A，Akira T，1999. Characterization of crosslinked silk fibroin gel. *Science of Sericulture*，25(2)：108-112.［闵思佳，姚菊明，朱良均，阿部康次，寺本彰，1999. 具有交联结构的丝素蛋白质凝胶的理化特性. 蚕业科学，25(2)：108-112］

Qiu JD，Rong LQ，Liang RP，Tan XC，Zhou XY，Mo JY，2004. Prediction of transmembrane protein structure based on hydrophobicity wavelet analysis. *Journal of Instrumental Analysis*，6(13)：1-4.［邱建丁，荣联清，梁汝萍，谭学才，邹小勇，莫金垣，2004. 基于疏水性小波分析的膜蛋白结构预测. 分析测试学报，6(13)：1-4］

Ru L，Huang YP，Chen P，Qi ZW，2007. Research methods on component compatibility of propellants. *Chemical Propellants & Polymeric Materials*，5(4)：26-36.［汝玲，黄毅萍，陈萍，齐正旺，2007. 蚕丝蛋白最新研究进展. 化学推进剂与高分子材料，5(4)：26-36］

Song ZP，Yu WX，2000. A stringent finishing agent for basketball leather. *Polyurethane Industry*，2000，15(4)：21-24.［宋兆萍，于文祥，2000. 篮球革用增涩整饰剂. 聚氨酯工业，2000，15(4)：21-24］

Wang HW，Zhang CH，Cui WZ，Liu XL，Zhou YC，Cai Y M，Mou ZM. Studies on secretory organs of cocoonase and silkmoth-vomiting fluid of silkworm，*Bombyx mori*. *Science of Sericulture*，31(2)：136-141.［王厚伟，张翠红，崔为正，刘小龙，周元聪，蔡幼民，牟志美，2005. 家蚕蛾溶茧酶分泌器官及蛾吐出液的研究. 蚕业科学，31(2)：136-141］

You B，2002. Study on production technology of health drink containing silkworm cocoon fibroin peptides. *The Beverage Industry*，5(4)：39-41.［游斌，2002. 蚕茧丝素肽保健饮料生产工艺研究及应用. 饮料工业，5(4)：39-41］

Yao JR，Chen X，Zhou P，Shao ZZ，Yu TY，2003. Vibrational spectroscopy studies on the blend films of silk fibro in and silk-prote in like polymers. *Chemical Journal of Chinese Universities*，23(4)：8-10.［姚晋荣，陈新，周平，邵正中，于同隐，2003. 蚕丝蛋白与类动物丝蛋白聚合物共混膜的振动光谱研究. 高等学校化学学报，24(11)：2 113-2 115］

Zhao XY，Li JG，2006. Practical Technology of Molecular Biology. Chemical Industry Press，Beijing. 52-64.［赵晓瑜，李继刚，2006. 实用分子生物学技术. 北京：化学工业出版社. 52-64］

Zhao XL，Li MY，Yue H，Zhang Z，2007. Cloning of avian influenza virus gene（H5N1）NA and construction of its eukaryotic expression vector. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*，2：33-35.［赵雪丽，李明义，岳华，张志，2007. 禽流感病毒（H5N1）NA基因的克隆及其真核表达载体的构建. 上海畜牧兽医通讯，2：33-35］

（责任编辑：赵利辉）